

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DE 04/01178

**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

REC'D 03 AUG 2004

WIPO PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

BEST AVAILABLE COPY

Aktenzeichen: 103 26 187.7**Anmeldetag:** 06. Juni 2003**Anmelder/Inhaber:**
MedInnova Gesellschaft für medizinische Innovationen aus akademischer Forschung mbH,
35037 Marburg/DE**Bezeichnung:** Zellen als Träger für Bakterien**IPC:** C 12 N, A 61 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 1. Juli 2004
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident
Im Auftrag


Schäfer

Albrecht, Lüke & Jungblut
Patentanwälte
Gelfertstr 56, 14195 Berlin



DE-Patentanmeldung

Dipl.-Ing. Hans Albrecht
Patentanwalt (1933 - 1979)

Dipl.-Ing. Dierck-Wilm Lüke
Patentanwalt /European Patent Attorney /
European Trademark Attorney

Dipl.-Chem. Dr. Bernhard Jungblut
Patentanwalt / European Patent Attorney /
European Trademark Attorney

Anwaltsakte: MED/DE0307

Datum: 05.06.03/*

Anmelder: MedInnova Gesellschaft für Innovationen aus akademischer
Forschung mbH
Biegenstrasse 4
D-35037 Marburg

Titel: Zellen als Träger für Bakterien

Erfinder: 1) Dr. Joachim FENSTERLE, Hans-Sachs-Strasse 112, D-97204
Hoechberg,
2) Prof. Dr. Werner GOEBEL, Am Happach 12, D-97218
Gerbrunn,
3) Prof. Dr. Ulf R. RAPP, Rotweg 39, D-97082 Wuerzburg,
4) Jochen STRIZKER, Nopitschstrasse 8, D-97074 Wuerzburg,
5) Andreas SCHMIDT, Fanny Koenig STrasse 4, D-97299 Zell am
Main,
6) Priv.-Doz. Dr. Ivaylo GENTSCHEV, Bauweg 5, D-97270 Kist

Priorität: ---

Zellen als Träger für Bakterien

Gebiet der Erfahrung

5

Die Erfindung betrifft mit Bakterien infizierte Zellen sowie deren Verwendung zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, insbesondere zur Behandlung von Krebs.

10

Hintergrund der Erfindung und Stand der Technik

Zu den neuen Ansätzen einer Therapie von bislang unheil-
15 baren oder unzulänglich heilbaren Erkrankungen gehören die
verschiedenen Möglichkeiten der Gentherapie und der
Immuntherapie.

Bei der Gentherapie soll eine Nukleinsäuresequenz, welche
20 für ein gewünschtes Protein kodiert, durch geeignete
Träger in das Zielgewebe transportiert werden, dort in
Zellen eindringen und diese transduzieren zur Expression
des gewünschten Proteins. Zahlreiche unterschiedliche
technologische Ansätze zur Gentherapie wurden entwickelt
25 und geprüft. Insgesamt gesehen sind jedoch die klinischen
Ergebnisse dieser Prüfung der unterschiedlichen Ansätze
insgesamt wie auch im Besonderen bei Tumorerkrankungen
eher enttäuschend. Dies hat zum wesentlichen Teil tech-
nische Probleme als Ursache. So weisen die Träger für Nuk-
30 leinsäuresequenzen eine zu geringe Zielzellspezifität auf,
die Anzahl von Zellen, welche transduziert werden können,
ist zu gering und die Stärke und die Dauer der Expression

des gewünschten Proteins ist für einen therapeutischen Effekt zu niedrig.

Eine etablierte Form der Immuntherapie ist die Immunisierung mit einem Antigen, die sogenannte Vakzinierung.
Nach einer Immunisierung mit einem Antigen entstehen im Körper spezifische Antikörper und/oder spezifische zytotoxische Lymphozyten, welche prophylaktisch oder therapeutisch wirksam sind, beispielsweise gegen Infektionserreger. Seit einigen Jahrzehnten wird mit unterschiedlichen Ansätzen versucht, auch bislang unzulänglich behandelbare oder unheilbare Erkrankungen durch eine Vakzinierung zu behandeln. Im Vordergrund steht hierbei die Therapie von Tumorerkrankungen durch eine Tumorvakzinierung. Ziel ist, durch eine Tumorvakzine eine Immunantwort gegen den Tumor zu bewirken, welche zur Lyse von Tumorzellen und letztlich zur Elimination des gesamten Tumorgewebes führt. Mit den bislang geprüften unterschiedlichen Tumorvakzinen konnte bislang jedoch noch kein Durchbruch in der Tumortherapie erzielt werden. Ein wesentlicher Grund liegt in der sogenannten Immuntoleranz des Tumorträgers für seinen Tumor. So gelingt es mit einer Vielzahl von immuntherapeutischen Ansätzen zwar relativ gut, eine tumorspezifische T-Zellantwort zu induzieren, diese korreliert jedoch oft nicht mit der tumoriziden Wirkung (z. B. Thurner et al., Exp Med 190:1669-1678 (1999)). Neuere Erkenntnisse deuten auf unterschiedliche Ursachen hin. Zu diesen gehören die zu geringe Penetration des Tumorgewebes durch spezifische T-Zellen (Mukai et al., Cancer Research 59:5245-5249 (1999)) und/oder eine Inaktivierung von T-Zellen innerhalb des Tumors (beispielsweise durch TGF-β oder durch Expression von negativ regulatorischen Markern wie B7-H1 im Tumorgewebe oder durch Stimulation von immunsuppressiv

wirkenden regulatorischen T-Zellen (Übersicht: Bach, Nature Reviews, 3:189-198 (2003)).]

- In unterschiedlichen klinischen Phasen kommen derzeit mehrere Verfahren zur Tumorvakzinierung zum Einsatz, die häufig auf Dendritischen Zellen basieren (zusammengefasst in Bancherau et al., Cell, 106:271-4 (2001)). Die häufigste Art der Immunisierung mit Dendritischen Zellen umfasst die Aktivierung der Zellen ex vivo, deren Beladung „Pulsen“) mit Antigen (beispielsweise gereinigtem Protein, Tumorzellextrakt oder definierten Peptiden) und deren anschließenden Applikation. Alternativ werden auch Methoden verwendet, die eine Fusionierung von Zellen beinhalten. In diesem Fall werden beispielsweise bestrahlte Tumorzellen mit dendritischen Zellen durch geeignete Verfahren wie ein elektrisches Feld fusioniert und anschließend appliziert (Kugler et al., Nat Med 6:332-6 (2000)).]
- Mit Hilfe von rekombinanten attenuierten Bakterien wie beispielsweise Salmonellen und Listerien als Träger für ausgewählte Tumorantigene wurde eine neue Methode entwickelt, diese Immuntoleranz des Patienten für seinen Tumor zu durchbrechen (DE 102 08 653, DE 102 06 325, noch nicht offen gelegt). Der Mechanismus, über welchen diese Immuntoleranz durchbrochen werden kann, ist in allen Einzelheiten bislang noch nicht verstanden. Jedoch scheinen hierbei eine wesentliche Rolle zu spielen die nach Injektion erfolgende Anreicherung von Bakterien wie beispielsweise von Salmonellen oder Listerien im Tumorgewebe und die dort durch diese Bakterien verursachte Entzündung. So ist bekannt, dass nach einer i.v. Gabe von Salmonellen es zu einer Anreicherung dieser Bakterien im Tumorgewebe

- kommen kann. Kinetische Studien zeigten jedoch, dass in frühen Zeitpunkten nach einer i.v. Injektion von Bakterien nur wenige Bakterien im Tumorgewebe auffindbar sind und diese sich bevorzugt im Tumorgewebe herdförmig vermehren
- 5 können. Werden somit nach i.v. Injektion größere Mengen an Bakterien im Tumor beobachtet, so leiten sich diese aus relativ wenigen Vorläufern ab (Mei et al., Anticancer Res 22:3261-6 (2002)). Für eine therapeutische Anwendung beispielsweise im Sinne einer Gentherapie mit Salmonellen
- 10 als Genträger ist dieses jedoch ungünstig, da in diesem Fall keine gleichmäßige Besiedelung des Tumors erfolgt, sondern nur wenige Herde mit hoher Bakterienzahl entstehen.
- 15 Tumoren enthalten neben den eigentlichen Tumorzellen und dem Bindegewebe eine beträchtliche Anzahl von Leukozyten, im Besonderen von Lymphozyten (Tumor-infiltrierenden Lymphozyten; TIL) und von Makrophagen (Tumor-assoziierten Makrophagen; TAM). Es wird angenommen, dass die Tumorkontaktionsierung von Leukozyten durch Expressionsprodukte der Tumorzellen, im besonderen durch Cytokine, Endotheline sowie auch durch die Hypoxie beeinflusst wird (Sica et al., Int Immunopharmacol, 2: 1045-1054 (2002); Grimshaw et al., Eur J Immunol, 32:2393-2400 (2002)).
- 20 25 Die Funktion der im Tumor lokalisierten Leukozyten ist widersprüchlich. Besonders für TAM wurde eine antitumorale (Antigenpräsentation; Zytotoxizität; Funada et al., Oncol Rep, 10:309-313 (2003); Nakayama et al., AntiCancer Res 22:4291-4296; Kataki et al., J Lab Clin Med, 140:320-328 (2002)), wie auch eine das Tumorwachstum fördernde Aktivität (Sekretion von Wachstumsfaktoren; Förderung der Angiogenese und der Metastasierung; Leek und Harris J.,

Mammary Gland Biol Neoplasia, 7:177-189 (2002); verminderte Sekretion von zytotoxischen Zytokinen wie IL-1 alpha; IL-1beta; IL-6; TNF alpha; Kataki et al., J Lab Clin Med, 140:320-328 (2002) nachgewiesen.

5

Seit längerem wurde versucht, durch die Verabreichung von zytotoxischen Lymphozyten, TIL, Natürlichen Killerzellen, Makrophagen oder Dendritischen Zellen das Tumorwachstum zu beeinflussen. Die klinischen Ergebnisse waren jedoch widersprüchlich (Faradji et al., Cancer Immunol Immunotherap, 33:319-326 (1991); Montovani et al., Immunology Today, 13:265-270 (1992); Ravaud et al., British J of Cancer, 71: 331-336 (1995); Semino et al., Minerva Biotec, 11:311-317, (1999)). Experimentell konnte gezeigt werden, dass die 15 Injektion von gering aktivierten Makrophagen zu einer Förderung, von stark aktivierten Makrophagen zu einer Hemmung des Tumorwachstums führen kann (Montovani et al., Immunology Today 13:265-270 (1992)). Dabei scheint die Applikation aktiverter Makrophagen die Tumorlokalisation 20 zu begünstigen (Fidler, Adv Pharmacol, 30:271-326 (1974); Chokri et al., Int J Immunol, 1:79-84, (1990)). Auch die Injektion von Leukozyten, welche in vitro mit einer Gensequenz kodierend für ein antitumorales Protein transduziert worden waren, erbrachten klinisch bislang keinen 25 Durchbruch in der Behandlung von Tumoren (Hege and Roberts, Current Opinion in Biotechnology, 7:629-634 (1996)). Im Rahmen dieser Versuche wurde jedoch gezeigt, dass Leukozyten aber auch andere Zellen, insbesondere Tumorzellen, nach i.v. Injektion das Tumorgewebe erreichen können 30 (Shao J et al., Drug Deliv 2 (2001)) dass jedoch der weitaus größte Teil der applizierten Zellen in Normalgeweben wie Lunge, Milz und Leber ansiedeln (Adams J, Clin Pathol Mol Path 49:256-267 (1996)).

N

Technisches Problem der Erfindung.

- A
- 5 Der Erfindung liegt das technische Problem zu Grunde, Mittel zu schaffen, mittels welcher die Zielzelllokalisation, insbesondere Tumorlokalisierung, von Mikroorganismen, welche für Wirkstoffe codierende fremde DNA enthalten, verbessern lässt.

10

Erkenntnisse und Grundzüge der Erfindung sowie Ausführungsformen.

- 15 Der Erfindung liegt die Erkenntnis zu Grunde, dass Makrophagen oder dendritische Zellen, welche in vitro mit Bakterien infiziert, d.h. beladen wurden, diese nach intravenöser Verabreichung in das Tumorgewebe transportieren, dass die Menge der in dem Tumor lokalisierten Bakterien nach i.v. Injektion von in vitro mit Bakterien beladenen Makrophagen deutlich höher war als nach i.v. Injektion einer entsprechenden Menge freier Bakterien, dass selbst infizierte heterologe Tumorzellen sich in Tumoren anreichern, und dass dieser Effekt auch dann bestehen bleibt, wenn die infizierten Zellen zuvor durch Bestrahlung inaktiviert wurden.
- 20
- 25

Wurden Makrophagen beispielsweise als Träger für Samonellen verwendet, so ließen sich in zwei unterschiedlichen transgenen Tumormodellen (Lungentumormodell: Raf-transgene Mäus, Kerkhoff et al., Cell Growth Differ, 11:185-90 (2000), Brusttumormodell: Her-2 transgene Mäuse, Bouchard et al., Cell, 57:931-6 (1989)) 18 Stunden nach i.v.

Applikation der mit Salmonellen beladenen Makrophagen zehn mal mehr Salmonellen im Tumorgewebe nachweisen als nach i.v. Injektion einer entsprechenden Menge freier Salmonellen.

5

Ähnliches zeigte sich bei der Verwendung einer heterologen Tumorlinie. Die Tumorzellline 4T1 (ATCC Nr. CRL-2539) leitet sich aus einem Tumor des Brustdrüsengewebes von BALB/c Mäusen ab und wurde nach Infektion mit attenuierten 10 Listerien in dem beschriebenen Raf-Tumormodell (C57BL/6 Hintergrund) appliziert. Auch hier zeigte sich bei der Verwendung infizierter Zellen eine stark erhöhte Zahl von Bakterien im Tumorgewebe, die auch bei vorheriger Bestrahlung der Zellen bestehen blieb.

15

Grundsätzlich lassen sich diese überraschenden Beobachtungen somit auf beliebige Zellen ausweiten, soweit sich diese Zellen durch Bakterien infizieren lassen oder an diese Bakterien fest anhaften und damit Träger für diese 20 Bakterien sind. So zeigte sich beispielsweise in den o.a. Tumormodellen, dass die Lokalisation von Salmonellen im Tumorgewebe weitaus größer war nach i. v. Injektion von Tumorzellen, die infiziert waren mit Salmonellen als nach i. v. Injektion einer entsprechenden Menge freier 25 Salmonellen.

Bakterien besitzen insbesondere durch bakterielle Bestandteile wie Lipopolysaccharide (LPS), Zellwandbestandteile, Flagellen, bakterielle DNA mit immunstimulatorischen CpG 30 Motiven, die allesamt mit unterschiedlichen sogenannten Toll-Like Rezeptoren (TLR) auf Antigen-präsentierenden Zellen interagieren und diese somit stimulieren können, einen starken adjuvanten Effekt. Es ist daher zu erwarten,

dass eine Infektion von Zellen mit Bakterien und die Verbreichung dieser Zellen nicht nur eine verbesserte Anreicherung der Bakterien am Tumor bewirkt, sondern dass diese Infektion auch eine Entzündung und eine Verstärkung 5 der systemischen sowie lokalen Immunantwort zur Folge haben wird. Dadurch lässt sich diese Methode auch für eine Steigerung der lokalen Immunantwort im Rahmen einer Immuntherapie einsetzen.

10 Gegenstand der Erfindung sind somit Zellen eines Säugers, welche beladen sind mit Bakterien und die Verwendung dieser Zellen zur Vorbeuge oder Behandlung einer Erkrankung.

Zellen im Sinne dieser Erfindung können beispielsweise 15 sein autologe, allogene oder xenogene Makrophagen, Lymphozyten, Dendritische Zellen oder Tumorzellen. Bei der Verwendung von Tumorzellen werden diese vorzugsweise derart bestrahlt oder mit einem Zytostatikum behandelt, dass ihre Teilungsfähigkeit blockiert ist. Derartige Zellen 20 werden vorzugsweise aus dem Blut oder aus Tumoren mit dem Fachmann bekannten Methoden isoliert. Zur Verwendung können jedoch auch kommen in der Kultur etablierte autologe, allogene oder xenogene Zellen, sogenannte Zell-Linien aus Normalgeweben oder aus Tumoren. Derartige Zell-Linien sind 25 beispielsweise von Zellbanken wie der amerikanischen Gewebezelbank (ATCC) in beliebiger Zahl und Art erhältlich. Desweiteren können auch Zellen zur Verwendung kommen, die durch dem Fachmann bekannte Verfahren modifiziert wurden. Modifikationen umfassen hier insbesondere genetische Modifizierungen aber auch zusätzliche Beladung der Zellen wie 30 z. B. mit Peptiden, Proteinen, pharmakologischen Wirkstoffen oder viralen Partikeln.

Beladung im Sinne der Erfindung ist die Adsorption von Bakterien an die Zelle, die Phagozytose der Bakterien durch die Zelle und/oder die Infektion der Zelle.

- 5 Bakterien im Sinne der Erfindung sind beispielsweise gram-negative und grampositive Bakterien, vorzugsweise fakultativ intrazelluläre Bakterien, vorzugsweise Salmonellen oder Listerien, vorzugsweise solche Bakterien, welche teilungsfähig sind, jedoch keine Pathogenität für den Empfänger aufweisen oder in ihrer Virulenz attenuiert sind oder abgetötet sind. In der Virulenz attenuierte Bakterien sind beispielsweise dadurch gekennzeichnet, dass in mindestens einem Chromosom dieser Bakterien mindestens ein Gen für ein Stoffwechselenzym deletiert oder so mutiert ist, 10 15 dass das Stoffwechselenzym defekt ist. In diesen Bakterien kann i) ein Gen für ein Enzym zur Synthese von aromatischen Aminosäuren im Chromosom deletiert sein, beispielsweise das *aroA* Gen, welches für das erste Enzym in der Biosynthese von aromatischen Aminosäuren kodiert, so dass 20 diese Bakterien in ihrem Wachstum abhängig sind von der Anwesenheit aromatischer Aminosäuren ii) diejenigen Proteine, welche die Motilität der Bakterien ermöglichen, unbeeinträchtigt exprimiert werden, beispielsweise die Funktionsfähigkeit der Gene *iap* und *actA* erhalten ist, und 25 iii) das Gen *trps* kodierend für tryptophanyl-tRNA-synthetase im Chromosom deletiert sein, wobei in diese Bakterien Plasmide eingeführt worden sind, iv) deren Replikation stabilisiert wurde durch einen geeigneten "Replication origin", beispielsweise durch *ori pAMβ1* (Simon and Chopin, 1988), v) die das *trps* Gen kodierend für tryptophanyl-tRNA-synthetase enthalten, vi) die ein Gen für ein Endolysin, beispielsweise das Lysis Gen des Phagen All8 (*ply 118*; Loessner et al., 1995) unter der Kontrolle 30

eines im Cytosol von Säugerzellen aktivierbaren Promoters, beispielsweise des *actA* Promoters (*PactA*, Dietrich et al., 1998) enthalten, und vii) die mindestens eine Nukleotidsequenz kodierend für mindestens einen Wirkstoff 5 unter der Kontrolle eines in Bakterien oder in Säugerzellen aktivierbaren Promoters, enthalten, wobei die Aktivierung des Promoters zellunspezifisch, zellspezifisch, zellzyklusspezifisch, zellfunktionsspezifisch oder abhängig von Metaboliten, Arzneimitteln oder von der Sau- 10 erstoffkonzentration erfolgen kann.

Derartige Bakterien weisen durch den Verlust mindestens eines Gens für ein essentielles Stoffwechselprotein eine drastische Verminderung ihrer Virulenz beispielsweise gemessen an ihrer *in vivo* Vermehrungsfähigkeit auf und zeigen trotzdem eine erheblich gesteigerte Bactofection, eine Lyse der Bakterien im Cytosol, eine Freisetzung der in den Bakterien enthaltenen Plasmide und eine stabile Expression des vom Plasmid kodierten Wirkstoffes. Ein solcher bakterieller Mikroorganismus enthält in aller Allgemeinheit eine fremde Nukleinsäuresequenz, welche für einen Wirkstoff codiert und optional unter der Kontrolle einer regulatorischen Nukleinsäuresequenz steht, wobei in der chromosomal DNA des Mikroorganismus eine natürliche und 25 für die Expression eines bakteriellen Enzyms codierende Nukleinsäuresequenz des Bakteriums entweder deletiert oder mit der Maßgabe mutiert ist, dass ein hieraus entstehendes Translationsprodukt nicht-funktionell ist, und wobei der Mikroorganismus keine fremde Nukleinsäuresequenz enthält, 30 welche für das Enzym codiert.

Beispiele für intrazelluläre Bakterien sind: *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* strain BCG, BCG

11

substrains, M. avium, M. intracellulare, M. africanum, M. kansasii, M. marinum, M. ulcerans, M. avium subspecies paratuberculosis, Nocardia asteroides, andere Nocardia species, Legionella pneumophila, andere Legionella species
 5 Salmonella typhi, S. typhimurium, andere Salmonella species, Shigella species, Yersinia pestis, Pasteurella haemolytica, Pasteurella multocida, andere Pasteurella species, Actinobacillus pleuropneumoniae, Listeria monocytogenes, L. ivanovii, Brucella abortus, andere Brucella species, Chlamydia pneumoniae, Chlamydia trachomatis, Chlamydia psittaci and Coxiella burnetii.

Beispiele für Attenuierungen von Salmonellen sind:
 Inaktivierende Mutationen in einem pab Gen, einem pur Gen,
 15 einem aro Gen, asd, einem dap Gen, in nadA, pncB, galE, pmi, fur, rpsL, ompR, htrA, hemA, cdt, cya, crp, dam, phoP, phoQ, rfc, poxA, galU, metL, metH, mviA, sodC, recA, ssrA, ssrB, sirA, sirB, sirC, inv, hilA, hilC, hilD, rpoE, flgM, tonB oder slyA, und Kombinationen davon. Die inaktivierenden Mutationen der beispielhaft aufgeführten Gene zur Attenuierung von Salmonellen sind dem Fachmann geläufig.

Gegenstand der Erfindung sind des weiteren Zellen, welche
 25 Träger von Bakterien sind, wobei in diese Bakterien Nukleinsäuresequenzen eingeführt worden sind, welche für ein Protein kodieren, wobei diese Proteine vorzugsweise Wirkstoffe zur Vorbeuge oder Behandlung einer Erkrankung darstellen.

30

Derartige Proteine können beispielsweise sein: Antigene von Infektionserregern wie Viren, Bakterien, Mycoplasmen, Parasiten, Antigene spezifisch für Tumore, im Besonderen

Proteine kodiert von Oncogenen, Antikörper, Epitop-bindende Fragmente von Antikörpern und Fusionsproteine enthaltend mindestens ein Epitop- bindendes Fragment eines Antikörpers, gerichtet beispielsweise gegen ein Antigen 5 auf einer Tumorzelle, einem Lymphozyten wie beispielsweise einem T-Lymphozyten oder einer Endothelzelle wie beispielweise einer Tumorendothelzelle, Enzyme; im besonderen Enzyme zur Aktivierung von inaktiven Vorstufen eines Arzneimittels wie beispielsweise eine β -Glucuronidase, eine 10 Phosphatase, eine Hydrolase, eine Lipase, Immunsuppressive Cytokine wie beispielsweise IL-10, Immunstimulierende Cytokine wie beispielsweise IL-1, IL-2, IL-3 oder IL-6, Chemokine, Interferone, Wachstumsfaktoren wie beispielweise G-CSF, GM-CSF, M-CSF, FGF; VEGF oder EGF, oder 15 Inhibitorische Proteine für Cytokine, Chemokine, Interferone oder Wachstumsfaktoren.

Die Regulation der Expression dieser Gene in den Bakterien erfolgt durch geeignete Promotoren, wobei diese von den 20 Bakterien oder von Viren oder von Eukaryonten stammen und unspezifisch, zellspezifisch oder funktionsspezifisch aktivierbar sein können.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden dem Gen Nukleinsäuresequenzen angefügt, welche die transmembrane Expression oder die Sekretion des von dem Gen kodierten Proteines durch das Bakterium ermöglichen. Beispiele für derartige sogenannte Signalsequenzen sind in den Literaturstellen EP 1042495, EP 25 30 1015023 und Hess et al., PNAS USA 93:1458-1463 (1996) beschrieben.

Gegenstand der Erfindung ist des Weiteren die Verwendung einer erfindungsgemäßen Zelle für die Vorbeuge oder Behandlung einer Erkrankung. Vorzugsweise werden die erfindungsgemäßen Zellen verwendet, um eine Tumorerkrankung 5 oder eine Immunerkrankung zu behandeln. Hierzu kodiert das in die Bakterien eingefügte Gen ein Protein, welches i) tumorzytolytisch ist, ii) proinflammatorisch wirkt, iii) negativ regulierende Immunzellen inhibiert wie beispielsweise durch Inhibition von CTLA-4, von B7-H1 oder von 10 CD25 oder von TGF β , iv) immunsuppressiv wirkt oder v) eine inaktive Vorstufe einer zytotoxischen, immunmodulierenden oder immunsuppressiven Substanz in einen aktiven Wirkstoff verwandeln kann.

15 Zur Vorbeuge oder Behandlung einer Erkrankung werden vorzugsweise 100 bis 10^9 Zellen verabreicht, welche vorzugsweise pro Zelle etwa 0,1 (im statistischen Mittel) bis 100 Bakterien tragen. Derartige Zellen werden lokal auf die Haut, in den Kreislauf, in eine Körperhöhle, in ein 20 Gewebe, in ein Organ oder peroral, rektal oder bronchial mindestens einmal verabreicht.

Erkrankungen, bei welchen die erfindungsgemäßen Zellen verwendet werden, stellen beispielsweise Tumorerkrankungen, Autoimmunerkrankungen, chronische Entzündungen und 25 Organverpfanzungen dar.

Im Folgenden wird die Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

30

B Beispiele zur Verdeutlichung der Erfindung

Beispiel 1: Lieferung von *Salmonella typhimurium* 7207
durch infizierte autologe
Knochenmarksmakrophagen

- 5 1.1: Isolierung von Knochenmarksmakrophagen (MΦ).
Es wurden ca. 2-3 Monate alte BxB23, bzw. ca 2 Monate alte
MMTV/neu transgene Mäuse für die Isolierung von Knochen-
marksmakrophagen verwendet. Die Isolierung der Makrophagen
erfolgte nach folgendem Protokoll: i) Oberschenkelknochen
10 der Maus entfernen, ii) Knochen in Petrischale von
Weichteilen befreien und an beiden Seiten aufschneiden,
iii) Knochenmark mit 2 ml DMEM 10 (DMEM Gibco mit 10% FCS
Gibco, 2mM L-Glutamin Gibco, 50 µM β-Merkaptoethanol
Gibco) mit Hilfe einer Spritze in Bluecap mit DMEM 10
15 spülen, iv) Zentrifugation für 5' bei 1200 rpm, absaugen
und in 5 ml Differenzierungsmedium aufnehmen. Auf eine
Zellzahl von 1×10^5 Zellen/ ml in Differenzierungsmedium
einstellen (DMEM 10 + 10 ng/ml GM-CSF (recombinant Mouse
Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor; RD Sys-
20 tems, Wiesbaden Cat.-Nr.: 415-ML) und in 5 ml Portionen in
Nunc Kulturschalen (NUNCLON™, 58mm, NUNC Nr.: 16955)
verteilen, v) 8 Tage bei 37°C und 10% CO₂ inkubieren, vi)
- 25 1.2: Infektion von Makrophagen mit *Salmonella typhimurium*
7207 (SL7207) *in vitro*.

Die an der NUNC-Zellkulturschale adhärierenden MΦ wurden
mit DMEM gewaschen und anschließend wurden mit einem
Zellschaber die adhärenten Zellen geerntet, gezählt und in
Differenzierungsmedium aufgenommen. Die Infektion mit
30 SL7207 (Hoiseth S.K. et al., Nature'291:238-239 (1981))
erfolgte nach folgendem Protokoll: i) 37°C, 1h im Brut-
schränk: MOI (multiplicity of infection) 1:20, ii) 10^6
Makrophagen wurden in 2 ml Medium in einer NUNC

Zellkulturschale ausgesät und mit 2×10^7 Bakterien (MOI = 20) 1 h bei 37°C inkubiert, iii) anschließend waschen, iv) mit Gentamycin (Endkonz. 100 µg/ml (Sigma)) 1h, 37°C inkubieren, v) waschen, Zellzahl bestimmen, ausplattieren auf 5 Brain Heart Infusion (BHI)-Platten (Gibco) für die Auszählung der bakteriellen colony-forming units (CFUs)

1.3: Ergebnisse der Beladung von Makrophagen.

Bei einer MOI von 20 und einer einstündigen Beladungsdauer 10 lassen sich konstant ca. 10^4 Salmonellen in 10^5 Makrophagen nachweisen. Die Beladungsdichte blieb für 12 Stunden nach der Beladung annähernd konstant und zeigt keinerlei Proliferation der Bakterien.

15 1.4: Applikation von „in vitro“ mit SL 7207 infizierten Makrophagen in BxB23 und MMTV/neu Tumormäusen.

Es wurden $5 \cdot 10^5$ in vitro infizierte Knochenmarks-Makrophagen, suspendiert in 100 µl PBS i.v. und pro Maus in die Schwanzvene von BxB23 bzw. MMTV/neu Tumormäusen 20 injiziert (die verwendeten Versuchstiere zeigten fortgeschrittene Tumorentwicklung, Alter ca. 12 Monate, bei den BxB23 Mäusen betrug die Lungenmasse durch die Lungen-tumoren 0,75 - 1,25g). Je nach Experiment wurde (durch Auszählung der CFUs bestimmt) pro Maus eine Bakterienzahl 25 von $3 - 5 \cdot 10^4$ S. typhimurium 7207 injiziert. Als Kontrolle wurden BxB23 und MMTV/neu Tumormäusen S. typhimurium 7207 i.v. ($2,5 \cdot 10^5$ Bakterien suspendiert in 100 µl PBS pro Maus) appliziert. Nach 18 Std. wurden die Tiere getötet und die CFU (ausplattiert auf BHI-Platten) 30 in der Lunge (BxB23) bzw. dem Tumor (MMTV) bestimmt. Verlaufsuntersuchungen der Infektion erfolgten in der Kontrollgruppe nach i.v. Injektion von S. typhimurium aroA 7207. Hierzu wurden mit dem gleichen Protokoll zu

unterschiedlichen Zeitpunkten die Bakterienzahl durch Bestimmung der CFUs untersucht.

1.5: Anreicherung von S. typhimurium 7207 in Tumoren nach i.v. Injektion: In den tumortragenden Lungen von BxB23 Mäusen, als auch in Mammatumoren von MMTV/neu Mäusen wurde nach Verabreichung von mit Salmonellen infizierten Makrophagen im Vergleich mit Tieren in der Kontrollgruppe, die mit freien Salmonellen behandelt worden waren, 18 Stunden nach der Infektion mehr als die zehnfache Menge an Salmonellen nachgewiesen. Nach Injektion von Bakterien beladenen Makrophagen war die Anreicherung der Bakterien schon 18 Stunden nach der Injektion so hoch (Faktor 10 höher wie bei der Injektion nackter Bakterien, siehe Fig. 1 und zugehörige Tabelle), wie sie vergleichsweise in der Kontrollgruppe (d. h. nach Injektion der Bakterien alleine) erst nach einigen Tagen (Tag 5 nach Infektion) erreicht werden konnte. Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Bakterienbeladenen Zellen konnten demnach eine deutlich größere Anzahl von Bakterien in einer wesentlich kürzeren Zeit in den Tumor angereichert werden als es nach Injektion der reinen Bakteriensuspension möglich war. Wurden an den Tagen 1, 7, 14 nach Injektion der erfindungsgemäßen Zellen die CFUs in den Lungen und den Organen bestimmt, so ergab sich, dass in den Lungen der tumortragenden BxB23 Mäusen die CFUs konstant hoch blieben oder zunahmen, während in den Lungen der C57BL/6 Kontroll-Mäuse wie auch in den Milzen der BXB23 Mäuse und der C57BL/6 Mäuse die CFUs deutlich unter die Werte in den jeweiligen Lungen sanken oder nicht mehr nachweisbar waren (siehe Fig. 2 und Fig. 3, sowie zugehörige Tabellen; Fig. 2 zeigt einen Vergleich der CFUs in Lungen von (Lungen-) tumortragende BxB23 Mäuse mit Lungen der Kontrolltiere C57BL/6, Fig. 3 einen

ZD

Vergleich der CFUs in den Mammatumoren und in der Milz von MMTV/neu Mäusen nach i.v. Injektion von 5×10^5 S.typhimurium).

5

Beispiel 2: Lieferung von L. monocytogenes durch infizierte heterologe Zellen

- 4T1 Zellen (ATCC CRL-2539) einer Tumorlinie aus einem Brustdrüsentumor von BALB/c Mäusen wurden mit dem attenuierten L. monocytogenes Stamm und einer MOI von 10 über einen Zeitraum von 1 h infiziert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und freie Bakterien durch eine Stunde Inkubation in Anwesenheit von Gentamycin abgetötet. Die Bestimmung der CFUs ergab eine Beladung der Zellen mit 0,15 Bakterien pro Zelle. Die Zellzahl wurde auf 5×10^6 Zellen pro ml in PBS eingestellt. Zusätzlich wurde ein Teil der infizierten Zellen durch Bestrahlung inaktiviert. In tumortragende BxB23 Mäuse (Alter > 10 Monate) oder C57BL/6 Mäuse gleichen Alters wurden pro Maus 0,1 ml dieser Suspension [d.h. 5×10^5 infizierte Zellen (gemessene CFU Listerien: $7,3 \times 10^4$), $3,5 \times 10^5$ infizierte und bestrahlte Zellen oder (gezählte CFUs) $3,5 \times 10^5$ freie Listerien in jeweils 100 µl PBS] i.v. injiziert.
- Bei der verwendeten Strahlendosis erfolgt eine über die CFU Bestimmung nachgewiesene Reduktion freier Bakterien um maximal 25%, wodurch sich im Falle bestrahlter Zellen rechnerisch eine Infektionsdosis von ca. $3,8 \times 10^4$ Bakterien ergab.
- 17 h nach der Infektion wurde die bakteriellen CFUs in der Lunge und Milz durch serielles Plattieren auf BHI Platten (Gibco) bestimmt (Detektionslimit 10 Bakterien pro Organ).

30

17 h nach der Infektion wurde die bakteriellen CFUs in der Lunge und Milz durch serielles Plattieren auf BHI Platten (Gibco) bestimmt (Detektionslimit 10 Bakterien pro Organ).

Dabei zeigten entsprechend der nachweisbaren CFUs in der Milz alle Tiere eine erfolgreiche Infektion. In den Lungen von tumortragenden BxB23 Mäusen, wie auch von den C57BL/6 Kontroll-Mäusen war die Anzahl der CFUs nach Injektion der erfindungsgemäßen lebenden oder bestrahlten Zellen deutlich höher als nach Injektion der Bakteriensuspension, wobei die Bakterienanzahl nach Injektion der erfindungsgemäßen Zellen in den Lungen der tumortragenden BxB23 Mäuse im Vergleich zu den der Bakterienanzahl in den Lungen der C57BL/6 Kontroll-Mäusen deutlich erhöht war (Faktor 10). In der Milz waren in allen Gruppen erheblich mehr bakterielle CFUs nachweisbar als in der Lunge, jedoch konnte kein deutlicher Unterschied in der Zahl der bakteriellen CFUs nach Injektion der erfindungsgemäßen Zellen oder der Bakteriensuspension sowohl bei tumortragenden BxB23 Mäusen wie auch bei den C57BL/6 Kontroll-Mäusen nachgewiesen werden (siehe Fig. 4 und die zugehörige Tabelle).

Wie bereits in den o.a. Kontrollgruppen zu den Versuchen mit Makrophagen, beladen mit Virulenz-attenuierten S. typhimurium 7207, dargestellt, vermindert sich auch bei Virulenz-attenuierten L. monocytogenes innerhalb eines Zeitraumes von etwa 5 Tagen, maximal jedoch 14 Tagen nach Injektion sowohl der erfindungsgemäßen Zellen wie auch der reinen Bakteriensuspension die Anzahl der bakteriellen CFUs in der Milz wie auch in anderen, nicht tumorbelasteten Organen sowohl bei den tumortragenden BxB23 Mäuse wie auch bei C57BL/6 Kontroll-Mäusen auf Werte, welche deutlich unterhalb der Werte der CFUs in den Lungen der (Lungen-) tumortragenden BxB23 liegen.

Im Gegensatz hierzu bleibt in den Lungen der (Lungen-) tumortragenden BxB23 Mäusen die initial erhöhte Anzahl von

75

19

bakteriellen CFUs nach Injektion der erfindungsgemäßen Zellen über den gesamten Zeitraum zumindest bestehen oder nimmt sogar noch anfänglich zu, um erst nach einer längeren Plateauphase wieder abzusinken.

5

10

15

20

25

30

LP

Tabelle 1: Bakterienzahl in Lungen oder Tumoren infizierter Mäuse 18 Stunden nach i.v. Injektion von infizierten Makrophagen oder freien Salmonellen.

Mauslinie	S.t. + Makrophagen			S. typhimurium		
	CFU	SEM	n	CFU	SEM	n
BxB 23 (Lunge)	9.000	3.600	3	0	0	2
MMTV Her (Tumor)	5.850	1.552	4	66	66	2

Tabelle 2: Vergleich der CFUs in Lungen von (Lungen-) tumortragenden BxB23 Mäuse mit Lungen der Kontrolltiere C57BL/6.

Tag	BXB23			WT C57\Bl6		
	CFU	SEM	n	CFU	SEM	n
2	1.485	1.335	2			
3	1.255	229	7	700	600	2
4	910	210	2			
5	2.469	1.503	6			
7	4.499	1.694	6	500	400	2
14	2.900	1.700	2	750	250	2
18	2.225	975	2			

Tabelle 3: Vergleich der CFUs in den Mammatumoren und in der Milz von MMTV/neu Mäusen nach i.v. Injektion von 5×10^5 S.typhimurium aroA

Tag	Tumor			Milz		
	Log(CFU)	SEM	n	Log(CFU)	SEM	n
3	2,67	0,24	2	4,65	0,10	2
4	3,19	0,68	4			
18	3,20	0,20	2	2,14	0,06	2

17

Tabelle 4: Bakterienzahl in infizierter Mäuse 17 Stunden nach Infektion mit infizierten 4T1 Brusttumorzellen mit (irrad. Cells) oder ohne (inf. Cells) Bestrahlung mit 25 gray oder freien Listerien.

	BxB 23			C57BL/6		
	inf. Zellen	inf. bestrahlte Zellen	L. mon. aroA	inf. Zellen	L. mon. aroA	
Log(CFU)	3,572	2,437	0,6344	2,601	0,4337	
SEM	0,1333	0,5261	0,6344	0,01688	0,4337	
n	3	3	3	3	3	3

Tabelle 5: Bakterienzahl in der Milz infizierter Mäuse 17 Stunden nach Infektion mit infizierten 4T1 Brusttumorzellen mit (irrad. Cells) oder ohne (inf. Cells) Bestrahlung mit 25 Gray oder freien Listerien.

	BxB 23			C57BL/6		
	inf. Zellen	inf. bestrahlte Zellen	L. mon. aroA	inf. Zellen	L. mon. aroA	
Log(CFU)	5,224	2,934	4,045	4,37	4,57	
SEM	0,1596	0,4338	0,9131	0,3023	0,2573	
n	3	3	3	3	3	3

Patentansprüche:

- 1.) Zelle von Säugern, welche mit Bakterien beladen ist, zur Prophylaxe oder Therapie einer Erkrankung, wobei die Zelle autolog, allogen oder xenogen, und ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus "Makrophagen, Dentritische Zellen, Granulozyten, Lymphozyten, Tumorzellen und Gewebezellen".
- 10 2.) Zelle nach Anspruch 1, welche durch Bestrahlung oder andere Methoden inaktiviert ist.
- 15 3.) Zelle nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Bakterien lebend, nicht virulent, in ihrer Virulenz attenuiert oder tot sind.
- 20 4.) Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Bakterien ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus "Mycobacterium tuberculosis, M. bovis, M. bovis strain BCG, BCG substrains, M. avium, M. intracel-lilare, M. africanum, M. kansasii, M. marinum, M. ulcerans, M. avium subspecies paratuberculosis, Nocardia asteroides, andere Nocardia species, Legionella pneumophila, andere Legionella species, Salmonella typhi, S. typhimurium, andere Salmonella species, Shigella species, Yersinia pestis, Pasteurella haemolytica, Pasteurella multocida, andere Pasteurella species, Actinobacillus pleuropneumo-niae, Listeria monocytogenes, L. ivanovii, Brucella abortus, andere Brucella species, Chlamydia pneumo-niae, Chlamydia trachomatis, Chlamydia psittaci und Coxiella burnetii".

- 5.) Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die
5 Bakterien rekombinante DNA tragen, wobei die DNA für
mindestens einen Wirkstoff kodiert.
- 10 6.) Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei minde-
stens ein Wirkstoff mit Hilfe geeigneter Promotoren
durch die Bakterien selbst produziert wird oder des-
sen Expression unter der Kontrolle eines eukaryon-
tischen Promoters steht.
- 15 7.) Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die
Produktion intrazellulär, membranständig oder sek-
retiert erfolgt.
- 20 8.) Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 7, bei welchem
der Wirkstoff ausgewählt ist aus der Gruppe beste-
hend aus "Antigene von Infektionserreger ~~wie~~ Viren,
Bakterien, Mycoplasmen, Parasiten, Antigene spezi-
fisch für Tumore, im Besonderen Proteine kodiert von
Oncogenen, Antikörper, Epitop-bindende Fragmente von
Antikörpern und Fusionsproteine enthaltend minde-
stens ein Epitop- bindendes Fragment eines Antikör-
pers, gerichtet ~~wie~~ beispielsweise gegen ein Antigen auf
einer Tumorzelle, einem Lymphozyten ~~wie~~ beispiel-
sweise einem T-Lymphozyten oder einer Endothelzelle
~~wie beispielsweise~~ einer Tumorendothelzelle, Enzyme,
im besonderen Enzyme zur Aktivierung von inaktiven
Vorstufen eines Arzneimittels ~~wie~~ beispielsweise
eine β -Glucuronidase, eine Phosphatase, eine Hydro-
lase, eine Lipase, Immunsuppressive Cytokine ~~wie~~
beispielsweise IL-10, Immunstimulierende Cytokine

zu abs.

wie beispielsweise IL-1, IL-2, IL-3 oder IL-6, Chemokine, Interferone, Wachstumsfaktoren wie *zu abs.*, beispielsweise G-CSF, GM-CSF, M-CSF, FGF, VEGF oder EGF oder Inhibitorische Proteine für Cytokine, Chemokine, Interferone oder Wachstumsfaktoren".

5

9.) Verwendung einer Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 8 für die Prophylaxe oder Therapie einer Erkrankung, wobei der Wirkstoff negativ regulatorische Elemente im Tumorgewebe blockiert.

10

10.) Verwendung einer Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 8 für die Prophylaxe oder Therapie einer Erkrankung, wobei die Bakterien als proinflammatorisches Stimulans in Tumorgewebe dienen.

15

11.) Verwendung einer Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 8 für die Prophylaxe oder Therapie einer Erkrankung, wobei Dendritische Zellen oder Makrophagen gleichzeitig als Träger für ein Impfantigen eingesetzt werden.

20

12.) Verwendung einer Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 8 für die Prophylaxe oder Therapie einer Erkrankung, wobei der Wirkstoff und/oder das Impfantigen ex vivo auf die Dentritische Zellen oder auf die Makrophagen beladen wird.

25

13.) Verwendung nach Anspruch 12), wobei das Impfantigen aus definierten Peptiden besteht.

30

25

- 14.) Verwendung nach Anspruch 10), wobei die Zelle fusioniert ist mit einer anderen Zelle, welche ein Gewebeantigen oder ein Tumorantigen exprimiert.
- 5 15.) Verwendung nach Anspruch 14, wobei die fusionierten Zellen autologe Tumorzellen sind.
- 10 16.) Verwendung der Zellen nach einem der Ansprüche 1) bis 8 für die Prophylaxe oder Therapie einer Erkrankung.
- 15 17.) Verwendung einer Zelle, insbesondere nach einem der Ansprüche 1 bis 8, welche mit einem eine fremde DNA enthaltenden Mikroorganismus, insbesondere bakteriellen Mikroorganismus, beladen ist, zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung.
- 20 18.) Verwendung nach Anspruch 17, wobei die fremde DNA für einen definierten Wirkstoff kodiert und wobei die pharmazeutische Zusammensetzung zur Prophylaxe oder Behandlung einer Erkrankung bestimmt ist, welche mit dem Wirkstoff verhinderbar und/oder behandelbar ist.

25

30

26

S

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die Verwendung einer Zelle, welche mit einem eine fremde DNA enthaltenden Mikroorganismus, 5 insbesondere bakteriellen Mikroorganismus, beladen ist, zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, wobei vorzugsweise die fremde DNA für einen definierten Wirkstoff kodiert und wobei die pharmazeutische Zusammensetzung zur Prophylaxe oder Behandlung einer Erkrankung 10 bestimmt ist, welche mit dem Wirkstoff behandelbar ist.

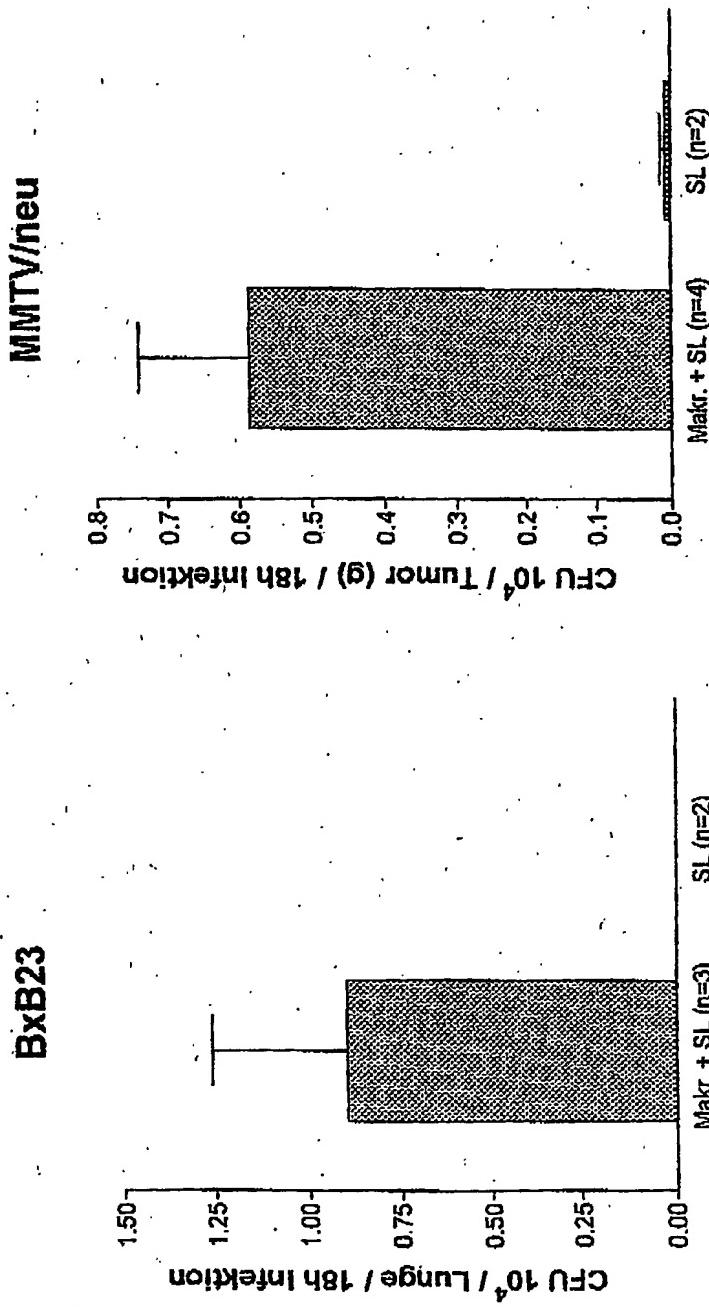
15

20

25

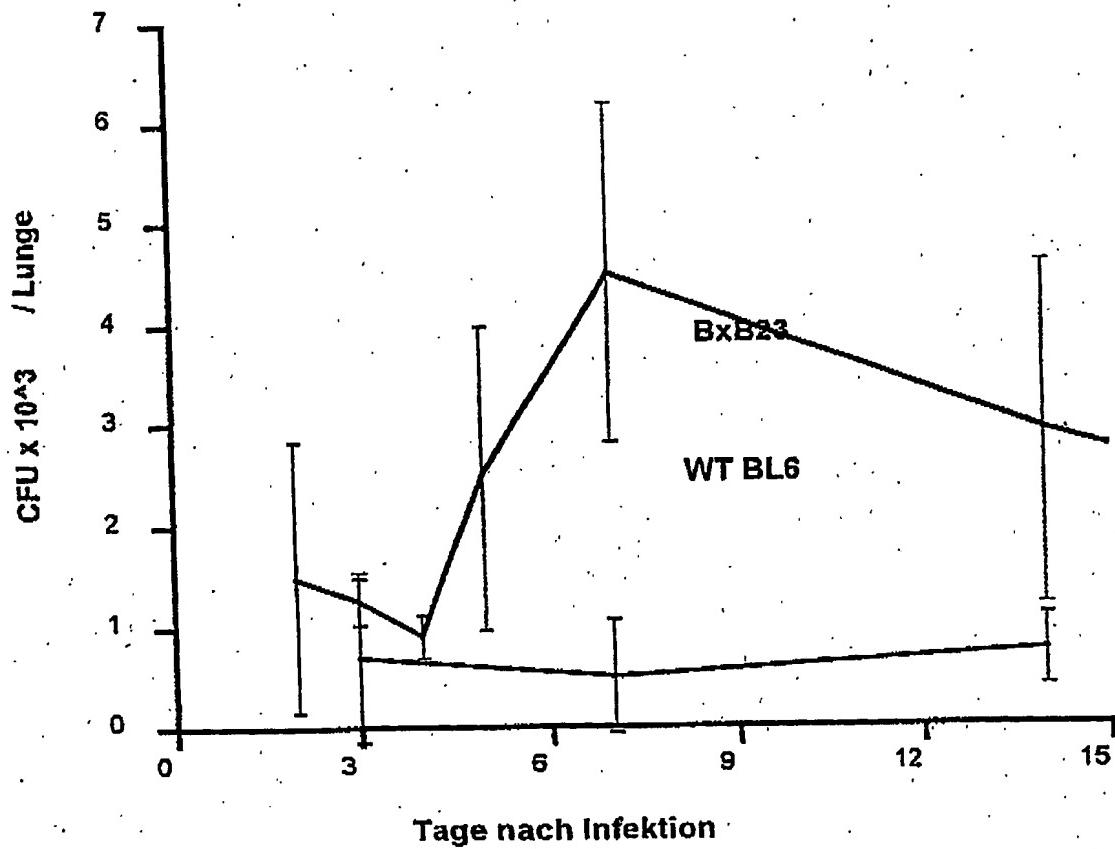
30

32

Fig. 1

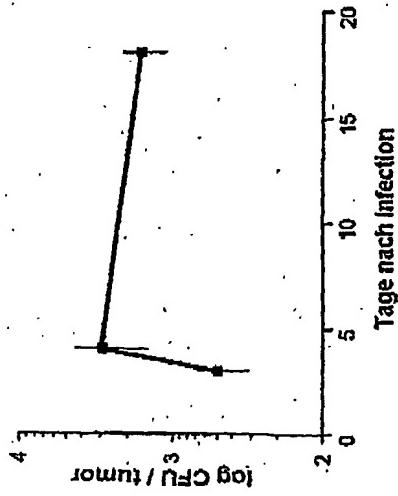
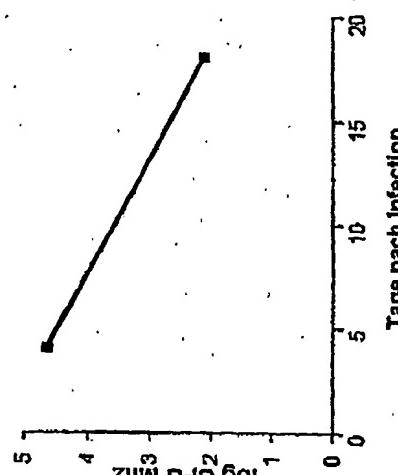
Bakterienzahl in Lungen oder Tumoren infizierter Mäuse 18 Stunden nach i.v. Injektion von infizierten Makrophagen oder freien Salmonellen.

25

Fig. 2

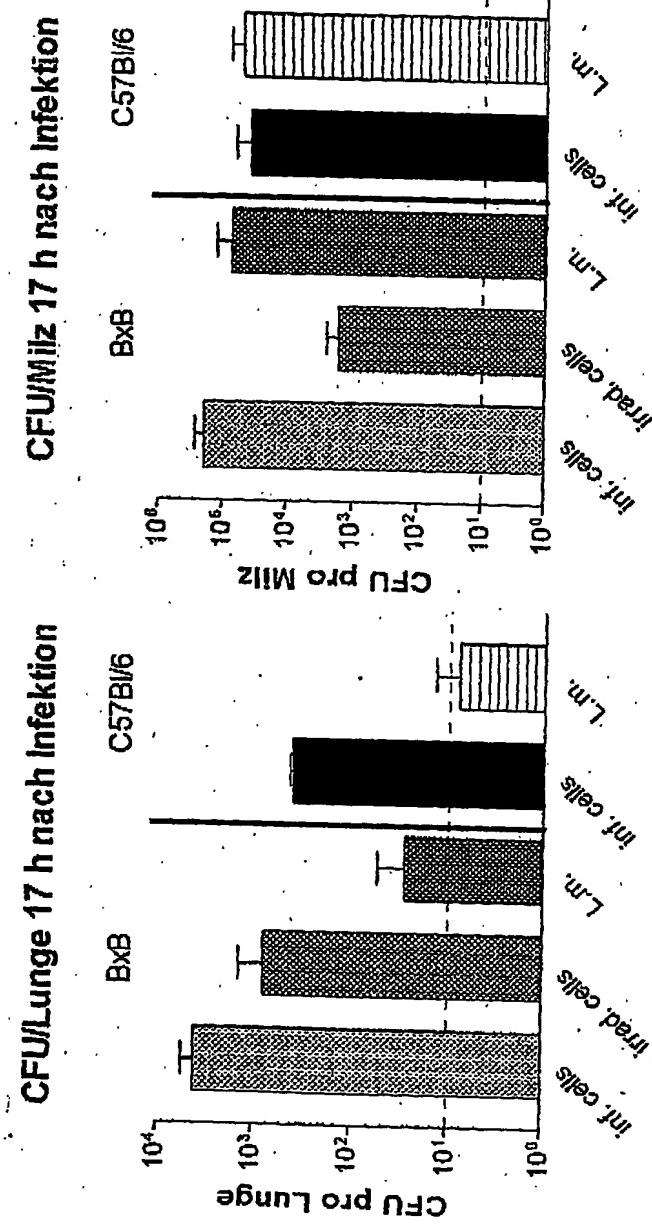
36

Fig. 3

Mammatumor**Milz**

Vergleich der CFUs in den Mammatumoren und in der Milz von MMTV/neu Mäusen
nach i.v. Injektion von 5×10^5 S.typhimurium

Fig. 4



Bakterienzahl in Lunge oder Milz infizierter Mäuse 17 Stunden nach Infektion mit infizierten 4T1 Brusttumorzellen mit (irrad. Cells) oder ohne (inf. Cells) Bestrahlung mit 25 gray oder freien Listerien.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.